

⑫ 公表特許公報 (A)

平4-501605

⑬ 公表 平成4年(1992)3月19日

⑭ Int. Cl.⁵
G 01 N 33/543
33/547
33/548

識別記号
Q 7906-2J
7906-2J
Z 7906-2J※

審査請求 未請求
予備審査請求 有
部門(区分) 6(1)

(全 10 頁)

⑯ 発明の名称 バイオセンサーシステムに使用する選択的生体分子相互作用の可能な検出表面

⑰ 特 願 平1-511405
⑱ 出 願 平1(1989)11月9日

⑲ 翻訳文提出日 平3(1991)5月9日
⑳ 国際出願 PCT/SE89/00642
㉑ 国際公開番号 WO90/05303
㉒ 国際公開日 平2(1990)5月17日

優先権主張 ㉓ 1988年11月10日 ㉔ スウェーデン (SE) ㉕ 8804073-8

⑰ 発 明 者 ベルイストリウム, ヤン スウェーデン国エス-740 22 ベーリング, リヨイニングス ヴ
エイエン 3

⑱ 出 願 人 ファーマシア・バイオセンソル・ スウェーデン国エス-751 82 ウプサラ (番地なし)
アクチエボラーク

⑲ 代 理 人 弁理士 高木 千嘉 外2名

⑳ 指 定 国 AT(広域特許), BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), FR(広域特許), GB(広域特許), IT
(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), SE(広域特許), US

最終頁に続く

請 求 の 範 囲

1. 銅、銀、アルミニウム及び金からなる群より選ばれた自由電子金属の膜からなり、前記膜の面の1つは有機分子 $X-R-Y$ (式中、Xは

非対称又は対称ジスルフィド ($-SSR'Y'$ 、 $-SSRY$)、スルフィド ($-SR'Y'$ 、 $-SRY$)、ジセレニド ($-SeSR'Y'$ 、 $-SeSeRY$)、セレニド ($-SeR'Y'$ 、 $-SeRY$)、

チオール ($-SH$)、イソニトリル、ニトロ ($-NO_2$)、セレノール ($-SeH$)、3価リン化合物、イソチオシアネート、キサンテート、チオカルバメート、ホスフィン、

チオ酸又はジチオ酸 ($-COSH$ 、 $-CSSH$) の群の1つに属し、ここでRとR'は炭化水素鎖であって好ましくは枝分かれしておらず、場合によりヘテロ原子により中断されており、及び10原子を超え、好ましくは12-30原子の長さであり(非対称分子の場合R'又はRはHであることができる)、及びYとY'は好ましくは同一であり、既知の本来リガンド又は生適合性多孔質マトリックスを共有結合させるための活性基、例えばヒドロキシル、カルボキシル、アミノ、アルデヒド、ヒドラジド、カルボニル、エポキシ又はビニル基である)の密に詰め込まれた単層で被覆されていることを特徴とするバイオセンサーに使用する検出表面。

2. 単層 $X-R-Y$ に結合し、及びそれを介して所望のリガンドを結合させることができる生適合性多孔質マ

トリックスを含むことを特徴とする請求の範囲第1項記載の検出表面。

3. 生適合性多孔質マトリックスはヒドロゲルであることを特徴とする請求の範囲第2項記載の検出表面。

4. ヒドロゲルは多糖類例えばアガロース、デキストラン、カラゲナン、アルギン酸、澱粉及びセルロース、又はこれらのいずれかの誘導体、又は膨潤性有機ポリマー例えばポリビニルアルコール、ポリアクリル酸、ポリエチレングリコール又はポリアクリルアミドであることを特徴とする請求の範囲第3項記載の検出表面。

5. ヒドロゲルはデキストランからなることを特徴とする請求の範囲第4項記載の検出表面。

6. ヒドロゲルは所望のリガンドを固定化させるためヒドロキシル、カルボキシル、アミノ、アルデヒド、カルボニル、エポキシ又はビニル基を含むように誘導体化され、及び場合により生特異的リガンドを前記基を介して結合させることを特徴とする請求の範囲第3項又は第4項のいずれか一項記載の検出表面。

7. デキストランは所望のリガンドを固定化させるためカルボキシル、アミノ、アルデヒド、カルボニル、エポキシ又はビニル基を含むように誘導体化され、及び場合により生特異的リガンドは前記基又はデキストランのヒドロキシル基を介して結合させたことを特徴とする請求の範囲第5項記載の検出表面。

8. ヒドロゲルは(1)反対電荷を持つ生体分子の濃縮を実現するための電荷した基、及び(2)検出表面に濃縮した生体分子を共有結合させるための反応性基を含むように活性化されたことを特徴とする請求の範囲第4項記載の検出表面。
9. 電荷した基はカルボキシル基であり、及び結合基は反応性エステル、ヒドラリド又は反応性ジスルフィド含有誘導体であることを特徴とする請求の範囲第8項記載の検出表面。
10. デキストランは(1)反対電荷を持つ生体分子の濃縮を実現するための電荷した基、及び(2)検出表面に濃縮した生体分子を共有結合させるための反応性基を含むように活性化されたことを特徴とする請求の範囲第5項記載の検出表面。
11. デキストランはカルボキシル基で活性化され、前記カルボキシル基の一部は反応性エステル、ヒドラリド、チオール又は反応性ジスルフィド含有誘導体の形態に活性化されたことを特徴とする請求の範囲第10項記載の検出表面。
12. 反応性ジスルフィド含有誘導体は反応性エステルと2-(2-ピリジニルジチオ)エタミンとの間の反応により形成されることを特徴とする請求の範囲第9項又は第11項のいずれか一項記載の検出表面。
13. 2-アミノエタントチオール誘導体を含むことを特徴とする請求の範囲第9項又は第11項のいずれか一項記

載の検出表面。

14. 単層X-R-Yに結合するリガンドを含むことを特徴とする請求の範囲第1項記載の検出表面。

明 細 書

バイオセンサーシステムに使用する選択的生体分子相互作用の可能な検出表面

本発明はバイオセンサーの分野に関し、より詳しくは選択的生体分子相互作用の能力のある表面を持つ金属表面を作る方法に関する。本発明は又所望のリガンドを結合させる活性化された表面、結合したリガンドを含む表面、及びそのような表面のバイオセンサーへの使用からなっている。

Alzawa (1983年)によれば、バイオセンサーは分子認識のためのリセプター、例えば固定化抗体を持つ選択的な層及び加工性シグナルへ相互作用情報を伝達するための変換器の特異な組合せであると定義される。そのようなバイオセンサーの一群はリセプターと周囲媒質との相互作用により表面の光学的性質に引き起こされる変化を検出するであろう。そのような方法の中で特に内腔共振法と表面プラズモン共鳴法を挙げることができる。この種類の方法が現実の實行において十分に働くためにはいくつかの要求、すなわち使用する検出表面(又は測定表面)か所望のリセプターを含み、更に如何なる非特異的結合すなわち原因する以外の成分の結合も生じない(又は無視し得る程度にのみ生ずる)ように容易に誘導体化されるという要求が満たされなければならない。やや簡略化した表現を用いると表面プラズモン共鳴法(略称SPR、

これはsurface plasmon resonanceの略称から導かれる)は金属薄膜に近接する層における屈折率の変化を反射光ビームの強度に結果として起こる変化により検出する方法であるといえる(Kaether, B(1977年)が参照される)。

検出表面はリセプター又は「リガンド」(以後それらをこのように呼称する)であり、これらは一般に1つ又はそれより多い生体分子と選択的に相互作用する分子又は分子構造である。

金属膜は使用する測定法に適した種類の基体で適用する。SPRの場合、これは誘電体物質例えばガラス板の形態のそれが光を金属表面に指向させるために使用することを意味する。

現在までに出版された大部分の刊行物によると、SPR法は生体分子の検出に適用する場合単純に問題の生体分子を直接金属表面に吸着させ、次いでその結果測定シグナルに現れる影響を調べるにより實行された。次の段階で、この表面は場合により最初に結合させた分子層に対して親和力を持つ分子(リガンド)の新しい層を結合させるために使用することができた。かくして例えばLiedberg, B等(1983年)は最初の研究において、最初にIgGの単層を銀表面に吸着させ次いで抗IgG層を前記単層に吸着させ、次に共鳴角に結果として起こる変化について影響を調べるにより、生化学的分析のためのSPR法の可能性を指摘している。

更にその他では、例えばCollen DC等(1987/88)は金

被覆面析格子を持つSPB法を使用してIgG/抗IgG系における免疫複合体形成を調べる場合、金属表面への生体分子の直接吸着を利用した。

欧州特 第257055号は金属膜をシリカで被覆し、場合によりシラン化試薬で処理する方法を記述しており、及び欧州 特第202021号では金属膜を有機膜例えば 異抗膜に対する抗体を含むことがあるそれで被覆している。抗体を共有結合させる可能性は実際に明細書に述べられているが、有機膜の実際の性質は全く開示又は示されておらず、又同じことが有機膜を作る方法に当てはまる。

欧州特許第254575号により、例えばSPB適用に適するような種類の光学的構造は金属膜を所謂「防曇減法」により有機ポリマーの層で被覆して作ることができる。好ましい態様においては硝酸セルロースが使用され、及び生特異的リガンドを層に結合させるための種々の公知の方法が挙げられる。

この種の刊行物は方法の可能性について指摘する一方、提案された技術的解決法に固有のいくつかの限界についても説明している。

例えば欧州特許第254575号で指摘されているように、問題の一つは生体分子が金属及びある種の無機表面と直接接触することにより少なくとも部分的な不活性化を受けやすいことからなる。他の厄介な問題はある種の特別な適用に望ましいいくつかのリガンドは安定な様式で金属表面に吸着されることができず、従って再現性ある結

果を得ることが期待できない。更に別の問題は生化学的基に存在する価質の多くは金属表面に腐蝕作用を持つことである。

この種の問題の少なくとも一部分は欧州 特第254575号による方法により解決され、この種類の構造はいくつかの明白な欠点を持っている。生体分子は硝酸セルロース膜に不可逆的に吸着されるというよく知られた事実から好ましい態様による硝酸セルロースの形態のポリマーコーティングはいくつかの可能な応用に制限を加えるであろう。光学的表面検出法に基づくバイオセンサー系においては、そのような現象は検出表面と例えばヒト血清試料に存在する成分との間の非特異的相互作用による不明瞭且つ再現性のないシグナルを生ずることがある。そのような副作用は欧州特許第254575号においては測定と対照表面の組合せを使用することにより校正された。この方法が働くための要件は非特異的寄与の大きさが両表面で等しいことである。しかしながらこの条件は現実の実施において常に満たされるわけではない。

他の問題は欧州特許第226470号で指摘されているように上述のそれと同様な構造物の製造に関連する（米国特許第4415668号も参照される）。明細書よりポリマーコーティングの許容される安定性、均一性及び再現性を得ることが如何に困難であるかを理解することができ、及びその結果生ずるバイオセンサー系を使用する場合の食の影響は容易に認識されるであろう。

15~20nmの厚さの硝酸セルロース型のポリマーコーティングの多くの實際使用の場合、腐蝕に対して実際に十分な保護を加えるが、それにも拘らず小分子がそのような層を透過し、金属表面に不可逆的腐化を引き起こす恐れがある。下に示すように現在の型の測定に関連してある状況で出会うような硫酸化合物、例えば有機チオール化合物がタンパク質のジスルフィド結合の還元剤に使用される場合金属に対して高い親和力を持ち、吸着された場合金属の光学的性質に対して制御されない腐化を生ずるであろう。又硝酸セルロース型のポリマーコーティングは例えば2% SDSによる界面活性剤処理により損傷を受けることが示された（欧州特許第254575号参照）。

バイオセンサーシステム特にSPB用の一般に有用な検出表面は次の要件を満たすべきである。

それは使用する媒質に対して化学的に低活性であるべきである。

それはタンパク質及び他の生体分子と適合し得るものであり、所望される以外の如何なる分子とも相互作用すべきでない。

この方法の種々な分析的課題に対する一般的適用性に要求されるような多数のリガンドとの共有結合を形成する能力を持つべきである。

高度の感受性と力学を獲得するため、表面は細孔分子をそこに結合させるため試料溶液用三次元マトリックスを提供すべきである。この方法で二次元表面を使用する

場合と比較して数量のより大きな部分がその屈折率の形で共鳴効果に影響することに利用されるであろう。

我々は今回好ましい態様において、これらの要件をとりわけよく満足する表面を作り出した。

この金属表面は自由電子金属例えば銅、銀、アルミニウム又は金の膜で構成される。これらの金属は異なる共鳴効果を与え、又銀はこの観点から極めて良好であるが、それにも拘らず腐食安定性を考慮して金が好ましい金属であると決定した。所望の生特異的リガンドを結合させるため、我々は金属表面に有機分子X-R-Yの単層を適用した。この単層は密に表面に詰め込まれており、リガンドの結合に使用される外、それは保存中極めて安定であり、及び金属表面を化学腐食から保護する有効なバリアー層を形成する。

一般にある種の硫酸化合物による金属表面の腐蝕は例えばRuzso 16等（1983年）、Porter 13等（1987年）、及びTroughton 13等（1988年）により記述されている。

密に詰め込まれた(densely packed) 単層(monolayer)の形態のX-R-Yは上述の刊行物に記述された原理により付着するようになり、結合は性質が部分的に共有結合であり、Xは金属に結合し、Yは官能性リガンドと結合する働きをする。これはリガンドの場合によりYの活性化後Yに直接結合させるか、又は生適合性多孔質マトリックス例えばヒドロゲルを、その上でマトリックスをリガンドと結合させるのに利用されるYを介してバリア

一層に結合させ ことにより実現され。

Xは次の群、すなわち

非対称又は対称スルフィド ($-SSR'Y'$ 、 $-SSRY$)、スルフィド ($-SR'Y'$ 、 $-SRY$)、ジセレニド ($-SeSeR'Y'$ 、 $-SeSeRY$)、セレニド ($-SeR'Y'$ 、 $-SeRY$)、

チオール ($-SH$)、ニトリル ($-CN$)、イソニトリル、ニトロ ($-NO_2$)、セレノール ($-SeH$)、8 値リン化合物、イソチオシアネート、キサンテート、チオカルバメート、ホスフィン、

チオ酸またはジチオ酸 ($-COSH$ 、 $-CSSH$) の 1 つに属する。

R (と R') は場合によりヘテロ原子により中断されており、好ましくは適当に密な詰め込みのため直鎖 (枝分かれしていない) であり、場合により二重及び/又は三重結合を含む炭化水素鎖である。鎖の長さは 10 原子を超えない。より短い鎖の場合、安定性のより劣る層を生ずる。一般に 12-30 原子の鎖長が好ましい。炭素鎖は場合により過剰酸化されることがある。

Y と Y' は好ましくは同一であり、それらの鎖的物質に直接又は活性化後結合できるような性質を持つ。Y (及び Y') は従って液体クロマトグラフィー法で固定化に使用される多くの基例えばヒドロキシル、カルボキシル、アミノ、アルデヒド、ヒドラジド、カルボニル、エポキシ、又はビニル基のいずれかであることができる。これら又は他の基による様々なリガンド例えば生体分子の結

合に關する多くの論文が文献中に見出され、従って利用可能な代替物質を選択することは当業者にとってたやすく明らかなことである。

この原理の明らかな変形は様々な有機分子 $X-R-Y$ の混合物の吸着を含む。これは更に例示体化の増加した容量を獲得す 目的、又は多官能性表面を得る目的で行うことができる。更にバリアー層は Rega BL 等 (1986 年) により記述されているような方法で様々な種類のより複雑な分子例えば互いに連結した 2 つ又はそれより多い炭素鎖を含む分子を用いて形成させることができる。

必要により、バリアー層中で分子を解離させることにより安定性を更に増加させることができる。これは R 又は Y 中の官能基例えば R 中の二重結合又は三重結合の光開始重合により達成することができ、例えば Ringsdorf 等 (1988 年) が参照される。

所望のリガンド又は生体分子が Y を介してバリアー層に直接結合している場合、上述の要件のいくつかは満たされ、許容できる結果を少なくともいくつかの実験的応用の場合に得ることがある。しかしながら好ましい具体化においては生適合性多孔質マトリックス例えばヒドロゲルをバリアー層に結合させ、及びこのマトリックスは数オングストローム〜数千オングストロームの厚さを持ち、鎖的生体分子に連したリガンドを固定化させるために使用される。実際の実施においてマトリックス層の厚さは使用する測定システムの測定場所における測定シ

グナルの大きさに適合し、それにより測定条件の最適設定が得られるように選択される。SPR 適用においてマトリックス層の厚さは好ましくは 5-10,000 オングストローム特に 5-1,000 オングストロームである。従来技術と比較して単位面積当たり相当に高いリガンド密度がこのに記述したマトリックスで得られ、この場合分子の結合は主として単層中で起こる。このようにして相当に増強された測定シグナルが得られ、システムを大きな分子範囲で有用なものにする。

ここで考慮され、現在マトリックスの好ましい具体化であるヒドロゲルは Merrill 等 (1986 年) により定義される。ヒドロゲル結合はタンパク質適合性と非特異的相互作用の最小化に関する前述の要件のすべてを満たす検出表面を得るために必須である。Merrill 等はヒドロゲル表面におけるそのような性質を示す多数の例を記述している。考えられる実際の適用により、いくつかの利用可能な選択から任意の特定のヒドロゲルを選ぶことができる。

ヒドロゲルは例えば多糖類例えばアガロース、デキストラン、カラゲナン、アルギン酸、澱粉、セルロース、又はこれらの誘導体例えばカルボキシメチル誘導体、又は水膨潤性有機ポリマー例えばポリビニルアルコール、ポリアクリル酸、ポリアクリルアミド、ポリエチレングリコールであることができる。

特にデキストラン型の多糖類は例えばセルロースとは

対称的に性質が非結晶性であり、このような関係においては極めて適当である。デキストランは生体分子を結合するマトリックスとしてクロマトグラフィー操作で極めて広範囲に使用されてきた。この思想が本来持つ利点の一つは現実はこの全技術が現在バイオセンサー適用、すなわち適当なリガンドが固定化されているバイオセンサー技術の最終段階に利用可能なことである。ヒドロゲルはバリアー層「金属-X-R-Y」に結合させるか、又はモノマー物質の適当な溶液からそのままの状態で形成させることができる。更に別の処理段階例えばその後のヒドロゲルの架橋は当業者にとって当然にたやすく明かであろう。

この種類の表面変性は特異的又は二者択一的に低い非特異的相互作用が一方の表面と他方のタンパク質又は他の生体分子との間で要求される他の技術分野にも利用することができる。挙げることができる例は生体分子分離のためのクロマトグラフィーシステムの一部であり、ここでは例えば金属フィルターは上述の方法で変性させた表面を持つことができる。これらの原理に従って毛細管型クロマトグラフィー用カラムを作ることも可能である。更に表面構造は「インビボ」型の環境で使用するための生適合性を獲得するように変性させ得ることは明らかである。意図する特定の使用分野により、例えばヒドロゲルの実際の選択は望ましくない相互作用を最小にするように行うことができる。当業者にとって上述の一連

の例から多くの別の使用分野はたやすく明らかであろう。

本発明を更に例証する具体例において、10-メルカプトヘキサデカノールの層が金属に結合し、この金属上でバリアー層のヒドロキシル基はエピクロロヒドリンで処理することによりエポキシ活性化される。次の段階でデキストランをエーテル結合を介してバリアー層に付着させる。次にデキストランマトリックスはリガンドを結合させるため公知技術例えば次の原理の一つにより活性化される。

一つの実例においては、ヒドラジド機能がアルデヒド基を含むリガンド例えばアルデヒド機能を含むように置換された炭水化物鎖を含む抗体を結合させるためデキストランマトリックス中に作られる。この場合デキストランマトリックスは最初にヒドラジド基を形成するように一部分反応を受けたカルボキシメチル基により変性される。この活性化されたマトリックスにより少なくとも二つの重要な利益が得られる。すなわち1)このマトリックスは未反応のカルボキシル基を含み、これは低いイオン強度条件下でイオン交換剤として働き、又静電的相互作用により固定化されるべきリガンドはデキストランマトリックスに結合される。2)このマトリックスはリガンドのアルデヒド基とマトリックスのヒドラジド機能とが結合することにより極めて有効にリガンドを結合させ表面に濃縮する。

又はジスルフィド含有リガンドの更新された共有結合に使用することができる。このようにして検出表面の化学的再生の能力を得ることができ、これは同一表面をいくつかの異なるリガンドの結合のための一般的用途に使用することができる。この方法は例えば生物学的相互作用を研究する場合にも使用することができ、この相互作用は固定化されたリガンドに保持されている生物学的活性により破壊されることはない。

本発明の一つの重要な態様は所定の分析で使用する検出表面を形成する一つ又はそれより多い層はバイオセンサーシステムのフローセルにおける表面に適切な試薬を添加することによりその場所で合成及び/又は官能化されることである。

要約すると、それと共に相互作用することにより生体分子の検出に使用することができる多数のリガンドが存在する。イオン交換性基、金属キレート化基及び種々種類の生体分子用リセプター例えば慣用的な液体クロマトグラフ法で知られているようなそれが複雑な測定システムにおいてさえ選別目的に適切なシステムの構築に使用し得ることはたやすく明らかであろう。

この検出表面の新規な種類は多数の試料成分分析のため多重検出表面からなるシステムで測定を実行することを可能にする。このようなシステムにおいては、各々の特定の検出表面はその場所で所望の特異性を獲得するように官能化されると極めて高度な多能性が得られる。こ

他の具体例においては、カルボキシメチル変性デキストランにおけるカルボキシル基の一部を反応性エステル機能を生ずるよう例えばN-ヒドロキシスクシンイミド及びN-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド塩酸の水溶液で処理することにより変性される。上述の場合と同じ方法で強電電荷すなわち未反応カルボキシル基はリガンドの表面への濃縮の進行に寄与するであろう。次いでアミノ基を含むリガンド例えばタンパク質とアミノ酸はデキストランマトリックスに共有結合により結合させることができる。

別な方法においては、前述の反応性エステルはジスルフィド含有化合物例えば2-(2-ピリジニルジチオ)エタノールアミンとの反応に利用される。この方法でジスルフィド基を含むマトリックスが得られ、及びこれらはチオール含有リガンド例えば免疫グロブリンの還元されたP(ab)断片との結合に使用することができる(Brocklehurst 氏等(1973年)参照)。ジスルフィド結合を例えば還元又はチオールジスルフィド交換により分裂させた後、形成されるチオール変性表面はジスルフィド含有リガンド例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジニル)プロピオネート(SPDP)変性タンパク質の結合に使用することができる。

この方法の利点はリガンドを例えば還元処理により分裂させて反応性チオールを持つ検出表面が得られることである。このチオール変性表面は類似の方法でチオール

の場合そのような検出表面は最初に活性化されたデキストラン層を含み、官能化は検出表面の各々の対応する一つに適当なリガンド層を通過させることにより実行される。その後試料溶液を多重検出表面を通過させ、結合させた成分が検出される。

少なくとも2つの検出表面を持つセンサーユニット並びにその官能化の方法は発明の名称が「センサーユニットとそのバイオセンサーシステムにおける使用(Sensorunit and its use in biosensor system)」と称する我々の係属中のPCT出願(スウェーデン特許第8804074-6号に基づく)の目的であり、その開示は参考例としてここに組み入れる。

一つの実例においては、いわゆるキメラ分子(二官能性又は多官能性分子)が検出表面を官能化させるため使用される。キメラ分子は基礎表面例えば前述のデキストラン被覆検出表面に結合しようとする部分と検出される生体分子に亲和力を持つ他の部分とからなる。デキストランの場合キメラ分子は生特異的リガンド例えば免疫グロブリンに共役結合するデキストランに対する抗体からなることができる。このようにデキストラン抗体と種々の特異性の基とを含む一連のキメラ分子を用いて、一装置中に同じ種類のいくつかの検出表面を含むいわゆる測定用カセットを多数の生体分子の併行検出のため簡単な方法で活性化させることができる。他の方法においては、検出表面は表面にキメラ分子を結合させるため所

ハブテンで固定させる。例えば上述の反応性エステル表面をテオフィリンアナログで誘導体化し、次いでキメラ分子を結合させるために使用することができ。この場合キメラ分子はテオフィリンを指向し、生 異的リガンドと結合する抗体からなる。これらの具体例から本発明の表面を使用する場合、使用 は同一の基盤表面を簡単な方法でその所望のリガンド(=所望のレセプター)のいずれかをそこに付着させるために使用することができるから、高度の多能性に到達し得ることは極めて明らかである。

(1)バイオセンサーシステムに使用する選択的抗体分子相互作用の可能な表面を持つ金属表面を作る前述の方法、(2)上述の表面、及び(3)それらのバイオセンサーへの使用に関する本発明は、下記の実施例により例証するがそれのみに限定されるものではない。金属はもちろん各々の場合意図する特定の測定法に適した基体、例えばSPRの場合はガラス板に適用される。基体の選択は本発明の部分を形成しない事実を考慮し、本明細書と同様に下の実施例は全体として検出表面、すなわちその上に付着した層を持つ遊離金属表面のみに関連する。

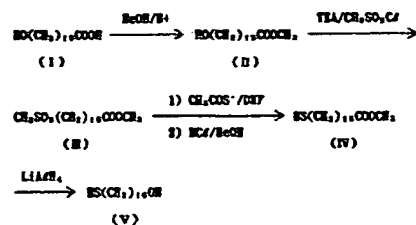
本発明の検出表面は種々のバイオセンサーシステム及び特にSPR例えば「光学的バイオセンサーシステム(Optical Biosensor System)」と称する我々の係属中のPCT出願(スウェーデン特許願第8804075-3号に基づく)に記述されているそれに使用することができ、その開示

は参考例としてここに組み入れる。

1. 検出表面製造の実施例

1.1 16-メルカプトヘキサデカノールの合成

16-メルカプトヘキサデカノールを次の反応略図により合成した。



16-メルカプトヘキサデカノールメチルエステル(IV)は公知の方法により調製した(Crossland EE等(1970年)、Ghosh SS等(1987年)及びVolante RP(1980年)、及びこれらの刊行物に引用されている参考例)。

(IV)の16-メルカプトヘキサデカノールへの還元は次のように実行した。

70mlのトルエンに溶解した16-メルカプトヘキサデカノールメチルエステル12.0g(41.7mmol)をトルエン中リチウムアルミニウムヒドライド-ビス-テトラヒドロフラン(1M)の70ml(70mmol)に重しく攪拌しながら注意深く滴加した。この滴加の間温度は25℃より下に維持した。

反応を室温で20分間進行させた。過剰のヒドライドを酢酸エチル次いで100mlの2M塩酸で分解した。層を分離した。水層を100mlのトルエンで抽出した。合併した有機層を100mlの2M炭酸水素ナトリウムで洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し蒸発した。

収量10.0g(87.2%) ; GLCによる純度98%。

生成物をメタノールからの再結を繰り返して精製した。>99%の純度は許容されると判断した。融点55.0~56.0℃。

1.2 Au被覆ガラス表面の基盤結合

1.2.1 16-メルカプトヘキサデカノールの化学吸着

5インチの金被覆ガラスウエハーを重を載えたペトリ皿(内径16cm)中に置いた。エタノール/水(80/20)中16-メルカプトヘキサデカノールの5.0ml溶液の40mlを表面に注いだ。ペトリ皿を40℃の恒温インキュベーターで20分間インキュベートした。表面を5×50mlの水、50mlのエタノール/水 80/20、及び5×50mlの水で洗浄した。表面のサイクリックボルタメトリー分析は図が有効に金の酸化を防ぐことを示した。

1.2.2 エピクロロヒドリンによる処理

16-メルカプトヘキサデカノールで被覆した表面を20.0mlの0.4M水酸化ナトリウム及び20.0mlのジエチレングリコールジメチルエーテル中2.0mlのエピクロロヒドリンの溶液に接触させた。25℃の恒温インキュベーター中で4時間反応を進行させた。表面を2×50mlのエタノール

及び5×50mlの水で洗浄した。

1.2.3 デキストランによる処理

13.5gのデキストラン(T500, Pharmacia)を40.5mlの水に溶解した。4.5mlの1M水酸化ナトリウムを添加し、溶液をエピクロロヒドリン処理表面上に注いだ。次に恒温インキュベーター中で25℃で20時間インキュベートした。表面を15×50mlの50℃の水で洗浄した。

1.3 基盤表面の誘導体化

1.3.1 ヒドラジド表面の合成

ブロモ酢酸2.5gを27gの2M水酸化ナトリウム溶液に溶解した。混合物を1.2.3によりデキストラン処理表面に注ぎ、28℃の恒温インキュベーターで16時間インキュベートした。表面を水で洗浄し、その後上述の手順を1回繰り返した。

洗浄した後、表面を20mlの水中0.8gのN-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド塩酸(EDC)で5分間処理し、次いで20mlの水中4.0mlのヒドラジンヒドロキシドを添加した。表面を25℃の恒温インキュベーターで16時間インキュベートし、次いで水で洗浄した。

1.3.2 反応性エステル機能を持つ表面の合成

30mlの水に0.8gのN-ヒドロキシスクシンイミドと1.15gのEDCを溶解した。混合物を1.3.1によるカルボキシメチル変性デキストラン表面に注ぎ、25℃の恒温インキュベーターで60分間インキュベートした。表面を水で

洗浄した。

1.3.3 テオフィリン表面の合成

0.1M 炭酸緩衝液 (pH 8.0) 中 5 mM の 8-(3-アミノプロピル)-テオフィリン (R.C. Boguski 等、1980 年) の塩酸を N-ヒドロキシスチレンイミドエステル活性化デキストラン表面 (実施例 1.3.2 による) と共に 25℃ で一晩インキュベートし、次いで表面を水で洗浄した。

II リガンドの固相体化した基礎表面への結合

II.1 抗 IgE 抗体

10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.5) 中抗 IgE 抗体 (Pharmacia Diagnostics AB) を O' Shannassy (1985 年) により記述された方法により 10 mM 過硫酸ナトリウムで溶液中で 20 分間酸化した。緩衝液を置換した後、抗体を 10 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0) 中でヒドラジド変性デキストラン表面に結合させた。結合しなかった抗体を 0.1M グリシン (pH 2.5) で洗脱した。

II.2 抗ベクター 2-ミクログロブリン抗体

抗ベクター 2-ミクログロブリン抗体 (Pharmacia Diagnostics AB) を実施例 II.1 のように酸化し、ヒドラジド変性デキストラン表面に結合させた。

II.3 ウサギ抗マウス IgG 抗体 (RAELC)

10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.5) 中 RAELC 抗体を N-ヒドロキシスチレンイミドエステル固相体化デキストラン表面に 20 分間かけて結合させ (実施例 I.3.2 による)、次いで

結合しない抗体を PBS 緩衝液 (pH 7.4) と 0.1M グリシン (pH 2.5) 中で表面を洗浄することにより除去した。

III SP2 法を使用する生体分子試験

検出表面をフローセル 持つ SP2 測定装置に導入した。光学装置を調整した後測定シグナルを一定流量条件下で時間の関数として調べた。

III.1 モノクローナル抗体の濃度とサブクラス同一性の測定

モノクローナル抗体を含む培養培地を検出表面上に RAELC 抗体の共有固定化した後注入した (実施例 II.3)。

第 1 図は (1) 培養培地の注入、(2) モノクローナル抗体を含む培養培地の注入、及び (3) 0.1M グリシン (pH 2.5) による再生について得られた応答曲線を示す。

第 2 図は種々な濃度のモノクローナル IgG1 抗体の標準曲線を示す。x 軸は 5 ~ 100 μ g 抗体の範囲で用量応答曲線の精度は $\pm 10\%$ より良好である。

第 3 図はサブクラス特異的試薬の注入と結合モノクローナルの IgG1 抗体としての同定を示し、図中 (1) 表面結合モノクローナル抗体であり、続いて (2) 抗 IgG2a、(3) 抗 IgG3、(4) 抗 IgG2b、及び (5) 抗 IgG1 の注入による結果を示す (これらは表面に結合する)。システムが可逆的に反復可能なことを立証するため、抗体結合とサブクラス同定を同一表面上で 100 回繰り返した。

III.2 抗テオフィリン複合体のセンサー分子の恒体としての親和力研究と速度論研究

した。

分析

結合テオフィリンを持つ検出表面は上述の複合体により容易に官能化される。2つの平行する検出表面、それらの 1つはタンパク質 A 複合体により他はタンパク質 G 複合体により官能化されているそれらを用いて、一連の免疫グロブリンにつきタンパク質 A 及びタンパク質 G との親和力をそれぞれ極めて迅速に比較することが可能であった。得られた結果は例えば Guss 等 (1986 年) により報告されているこれらの点に関する意見を補強している。

この実験は速度論と親和力の定性的測定を速やかに実行する可能性のみならず、それぞれの場合における適当な試薬を用いてそのような検出表面は広範囲の種々な検定に利用できることから本発明の検出表面を使用する方法の順応性をも例証するものである。

III.3 所調サンドウィッチ法を使用するベクター 2-ミクログロブリンの検定

実施例 II.2 により調製した抗ベクター 2-ミクログロブリン抗体を含む検出表面を用いてベクター 2-ミクログロブリン (Pharmacia Diagnostics AB) の測定を行った。検出表面に結合させたベクター 2-ミクログロブリンの測定シグナルを溶液中のその濃度の関数として、直接 (第一次応答) 及び第二次免疫吸着剤-標識抗体によりシグナル増強させた後 (第二次応答) の両方の場合に

タンパク質 A とタンパク質 G を抗テオフィリン抗体との複合体 (キメラ分子) の形態でテオフィリン表面に導入した。この方法でタンパク質 A 又はタンパク質 G と種々なサブクラスのモノクローナル抗体との間の相互作用を研究することができた。

複合体の調製

モノクローナル抗テオフィリン抗体 No. 459、種々な異なる IgG サブクラスのモノクローナル抗体、IgG1 サブクラス No. E 184、95 及び 121 のモノクローナル抗 IgE 抗体及び IgE を Pharmacia Diagnostics AB から入手した。抗テオフィリン抗体をペプシンで分解して F(ab)'-2 断片を形成させるか、又は無傷の抗体として使用した。タンパク質 A、タンパク質 G 及び SPDP は Pharmacia LKB Biotechnology AB から入手した。

タンパク質 A-抗テオフィリン複合体は Carlsson 等 (1978 年) により記述された方法によりこれら分子の双方の SPDP 変性により調製した。変性させたタンパク質 A を 10 mM の DTE (1,4-ジチオエリスリトール) で還元した後、1.8 の変性度 (分子当たりピリジルスルフィド基) を持つ抗テオフィリンの 3.8 μ g を 1.3 の変性度 (チオール/分子) を持つ還元されたタンパク質 A の 13.8 μ g と混合した。

混合を 0.1M 塩化ナトリウムを含む 0.1M リン酸緩衝液中で pH 7.7 で一晩進行させた。タンパク質 G の抗テオフィリンの F(ab)'-2 断片との複合体を同様の方法で調製

つき記録した。ここで調製被覆体は第一次結合させたベクター-2-1クログロブリンを介して表面に結合して所謂サンドウィッチ構造を形成する。この明白で実験的に簡単な方法は少なくとも10倍低い検出水準を与える。

IV 検出表面に吸着させたタンパク質量の測定

1.2.1に記述されたカルボキシメチル炭化糖タンパク質表面に吸着させたタンパク質の量を放射能法を用いて行った。 ^{14}C 又は ^{35}S でラベルしたタンパク質(免疫グロブリンG、キモトリプシノーゲンA及びトランスフェリン)をSPR測定装置の中に置いた表面にイオン交換により吸着した。表面が乾燥した後角度の変化を記録し、SPR測定装置から除いた。次いで表面上の ^{14}C ラベルタンパク質の量を表面からのベータ線放射を測定することにより装置中で定量化した。放射能法の検量は吸着させたタンパク質の表面濃度の絶対値を与える。第4図はSPR測定装置からの応答のベータ線測定から得られる表面濃度との関係を示しており、種々な実験条件で78の測定を行った。50ng/mm²までのタンパク質濃度を持つ表面が得られ、これはトランスフェリンの約10倍密な単層に相当する。これは記述されたヒドロゲルの能力を示し、本発明の生適合性多孔質マトリックスの検出表面を使用することにより達成される大きな測定シグナル増強効果を実証するものである。同様な表面濃度は反応性エステル鎖を持つ表面にタンパク質を固定化させることにより達成され、このことは種々なSPR測定における増強された

力学のためタンパク質の「多層結合」を作る可能性を示すものである。

参考文献

- Boguslanski EC等(1989年)、Immunossays: Clinical Laboratory Techniques for the 1980s, Nakamura RB, Dito VE及びTucker ES編集、巻: JBL, New York 1989、45~84ページ
- Brocklehurst E等(1973年)、Biochem J、133巻、573ページ
- Carlson J等(1978年)、Biochem J、173巻、723ページ
- Crossland RE等(1970年)、J Org Chem、35巻、3195ページ
- Cullen DC等(1978/88年)、Biosensors、3巻、211~225ページ
- Ghosh SS等(1987年)、J Org Chem、52巻、862ページ
- Guss B等(1988年)、The EMBO Journal、5巻(7号)、1567~1575ページ
- Liedberg B等(1983年)、Sensors and Actuators、4巻、289~304ページ
- Nerrill等(1988年)、Hydrogels in Medicine and Pharmacy、II巻、Peppas NA編集、1巻、CRC Press
- Huzzo RC等(1983年)、J Am Chem Soc、105巻、4481~4483ページ
- O'Shannessy DJ(1985年)、J Appl Biochem、7巻、

347ページ

Porter ED等(1987年)、J Am Chem Soc、109巻、3559~3568ページ

Raether B(1977年)、Physics of Thin Films、Hess G、Francombe E及びHoffman R編集、Academic Press、New York、145~261ページ

Regen SL等(1988年)、J Am Chem Soc、110巻、6094~6095ページ

Ringdorf B等(1988年)、Angew Chem Int Ed Engl、27巻、113~158ページ

Troughton EB等(1988年)、Langmuir、4巻、365~385ページ

Volante RP(1981年)、Tetrahedron Lett、22巻、3119ページ

FIG. 1

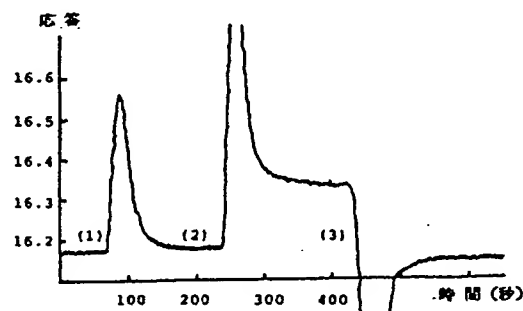


FIG. 2

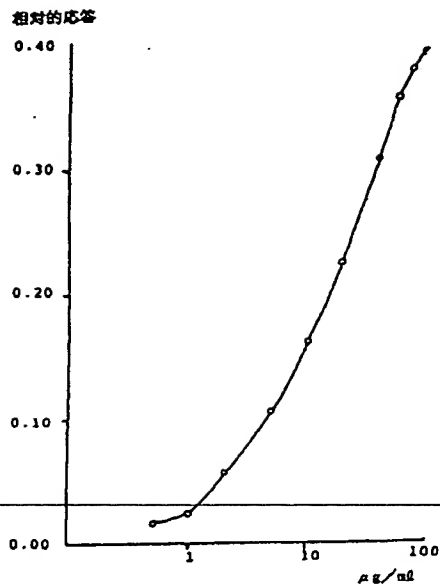


FIG. 3

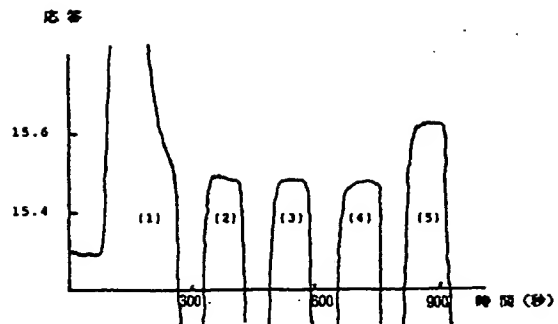
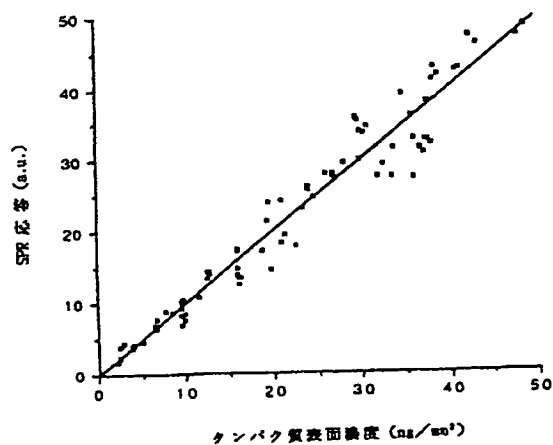


FIG. 4



国際調査報告

PCT/SE 89/00542

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		International Application No. PCT/SE 89/00542
IPC: G 01 N 33/53, 33/547, C 12 B 1/00		
2. FIELD SEARCHED		
3. CLASSIFICATION BY THE SEARCHING AUTHORITY		
IPC: G 01 N; C 12 Q; C 12 M; C 07 K		
4. CLASSIFICATION BY THE INVENTOR		
5. DOCUMENTS ASSIGNED TO THE INVENTION		
A	EP, A1, 0276142 (ARES-SERONO RESEARCH & DEVELOPMENT LIMITED PARTNERSHIP) 27 July 1988, see the whole document.	1-14
A	EP, A2, 0226470 (J.A. BOSLEY ET AL.) 24 June 1987, see the whole document.	1-14
A	EP, A2, 0254575 (ARES-SERONO RESEARCH & DEVELOPMENT LIMITED PARTNERSHIP) 27 January 1988, see the whole document.	1-14
A	Langmuir, Vol. 4, No. 2, 1988 E.B. Troughton et al.: "Monolayer films prepared by spontaneous self-assembly of symmetrical and unsymmetrical dialkyl sulfides", see page 363 - page 385	1-14
6. OTHER INFORMATION		
7. CERTIFICATION		
8. OTHER INFORMATION		

International Application No. PCT/SE 89/00642

IN DOCUMENTS REFERENCED TO OR DERIVED FROM THE SECOND SHEET

Category	Division of Research, and research, where appropriate, of the applicant	Division to which the
A	Biosensors, Vol. 3, 07/89 D.C. Cullen et al: "Detection of immune-complex formation via surface plasmon resonance on gold-coated diffraction gratings", see page 211 - page 225	1-14

From PCT 13A 500 (Latin American) January 1989

With search data the present family members relating to the present document filed in the above-mentioned International search report.

Patent document ref. to search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A1- 0276142	27/07/88	AU-O- 10631/88 JP-A- 63271152	28/07/88 09/11/88
EP-A2- 0225470	24/06/87	JP-A- 62155361	11/07/87
EP-A2- 0254575	27/01/88	AU-O- 76007/87 JP-A- 63100355	28/01/88 02/05/88

第1頁の続き

⑥Int. Cl. *

G 01 N 33/553

識別記号

庁内整理番号

7906-2J

⑥発明者 リョーフオス, ステファン

⑥発明者 ヨーンソン, ボー

スウェーデン国エス-752 28 ウブサラ, フローラガタン 16

スウェーデン国エス-743 00 ストルヴレータ, モンシエンスヴ
エイエン24